

法政大学学術機関リポジトリ

HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

# バイオアキュミュレーションとバイオアブソープション技術による金属資源化

|     |   |
|-----|---|
| 著者  | 小島 文歌   |
| 出版者 | 法政大学大学院理工学研究科   |
| 雑誌名 | 法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編  |
| 巻   | 60  |
| ページ | 1-2   |
| 発行年 | 2019-03-31  |
| URL | <a href="http://doi.org/10.15002/00022105">http://doi.org/10.15002/00022105</a> |

# バイオアキュミュレーションと バイオアブゾープション技術による金属資源化

## RECOVERY OF METAL IONS WITH BIOACCUMULATION AND BIOABSORPTION USING THE RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI*

小島文歌

Fumika KOJIMA

指導教員 山本兼由

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Metals are essential to the function of proteins in organisms. Structures and functions of proteins require metals such as manganese and iron. Recently, it is known that there are more than 25 species of biometal which are able to bind to over 50% of known proteins. For effective recovery of metal ions, I developed bioaccumulation and bioabsorption system using the recombinant *Escherichia coli*. (1) Development of the recombinant *Escherichia coli* accumulating molybdate. I isolated the *E. coli* expressing molybdate importer operon and molybdate-binding transcription factor gene. The intercellular level of molybdenum of the recombinant *E. coli* was much more than the parent type. (2) Development of the recombinant *Escherichia coli* absorbing terbium. I isolated the *E. coli* presenting terbium-binding peptide on its cell surface. ICP-AES analysis showed that the absorption of terbium on the recombinant *E. coli* was much more than the parent type. These results suggest that the recombinant *E. coli*s are available to recover metal ions from industrial wastes and sea water.

**Key Words** : bioaccumulation, bioabsorption, molybdenum, terbium, *Escherichia coli*

### 1. 緒言

金属は生体に不可欠な元素である。古くから、細胞内カチオンの恒常性に用いられるナトリウムやカリウム、タンパク質の構造や機能に必須なマグネシウムや鉄などが知られてきた。最近のゲノム科学などの研究から、生物が利用する金属は25種類を超え、タンパク質の半数以上がそれらの金属と結合することが明らかとなった[1, 2]。本研究では、大腸菌ゲノム機能を基盤として金属資源化を目指したバイオアキュミュレーションとバイオアブゾープション技術の開発を行った。

現在、精密機械などに多くの金属が利用されているが、限られた金属資源から積極的なリサイクルを導入する循環型経済システムの構築が期待される。金属資源化では、微生物を用いたバイオプロセスの応用が期待されるが、目的金属資源の特異性など多くの課題がある。大腸菌金属恒常性に関わるゲノム機能から、モリブデン資源化を可能とするバイオアキュミュレーション技術開発を行った。また、細胞が利用できないテルビウムの資源化に対して、大腸菌細胞表面に関わるゲノム機能からバイオアブゾープション技術開発を行った。

### 2. 実験方法

#### (1) 細胞内モリブデンの定量

大腸菌形質転換体を対数増殖期まで培養後、超音波処理により全タンパク質を抽出した。その後、チオグリコール酸を用いた吸光度測定[3]により、培養液 1 mL 中の Mo 量を算出した。また、マイクロメーターを用いた細胞数検定によって培養液 1 mL 中の細胞数を求めた。以上の値から 1 細胞における Mo 量を算出した。

#### (2) 細菌吸着金属の定量

金属イオン吸着媒体となる大腸菌株を定常期まで培養した。1 mL に懸濁した際に OD<sub>600</sub>=1.0 となるように培養液量を調製し集菌後、100 mM レアアース金属混合溶液を加えて懸濁・攪拌し、金属イオンを菌体に吸着させた。集菌・洗浄後、100 mM EDTA を加えて懸濁し、細胞に吸着した金属イオンを脱離させた。遠心分離により上清と細胞を分離し、脱離後上清中の金属イオン濃度を ICP-AES で検出した。

### 3. 実験結果と考察

#### (1) モリブデン資源化を可能とするバイオアキュミュレーション技術開発

大腸菌 K-12 株のモリブデンの恒常性は能動的取り込みシステムにより制御される[4]。モリブデン取り込みシステム遺伝子群 *modABC-modF*、モリブデン結合タンパク質遺伝子 *modE* を恒常的に発現させた大腸菌形質転換体を獲得した。この形質転換体は親株と比較してモリブデン酸の感受性が高まった。また、1 細胞あたりの細胞内モリブデン量を測定した結果、親株と比較して約 2 倍のモリブデン量を細胞に蓄積していることが明らかとなった。(図 1)。今後は、細胞内モリブデン濃度を高めるためモリブデン結合タンパク質遺伝子の改良が必要であると考え

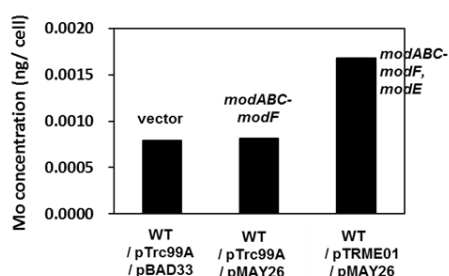


図 1 *modABC-modF*、*modE* 高発現大腸菌形質転換体における 1 細胞内 Mo 量の解析

#### (2) テルビウム資源化を可能とするバイオアブゾープション技術開発

カルモジュリンのカルシウム結合ドメインの変異解析からテルビウムと特異的に結合する約 20 アミノ残基からなるペプチドが単離された[5]。テルビウム結合ペプチドをコードする遺伝子を、大腸菌外膜タンパク質 *OmpC* の 8 つの細胞外領域のうち、N 末端、C 末端に最も近い部分に導入した変異 *ompC* 遺伝子を作製した (図 2)。

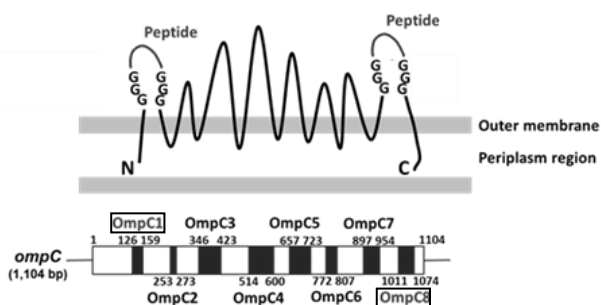


図 2 大腸菌外膜タンパク質 *OmpC* へのテルビウム結合ペプチドの挿入

変異 *ompC* 遺伝子をもつプラスミドにより形質転換させた大腸菌より外膜タンパク質を精製後、ウェスタンブ

ロットニングにより、変異 *OmpC* が外膜に存在することを確認した。その後、大腸菌形質転換体のテルビウム吸着能を評価するため、テルビウムを含む金属混合溶液と大腸菌形質転換体細胞を混合させ、ICP-AES によって細菌細胞に吸着した金属濃度を測定した (図 3)。その結果、ベクターと比較して *ompC* 発現プラスミドにより大腸菌細胞のテルビウム吸着が 1.6 倍上昇したことが確認された。さらに、*OmpC* の C 末端側にテルビウム結合ペプチドを導入した大腸菌形質転換体では、*ompC* 発現株と比較して、1.3 倍テルビウム吸着能が増加した。テルビウムと化学的性質が類似しているジスプロシウムの吸着能もテルビウムと同等であったことから、テルビウム結合ペプチドの特異性の向上が期待される。また、バイオアブゾープションに最も適した外膜タンパク質の探索も今後の課題である。

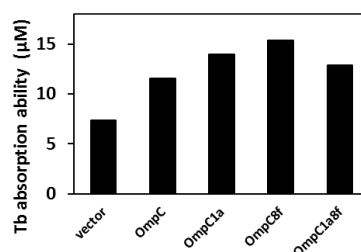


図 3 テルビウム結合ペプチド挿入大腸菌形質転換体におけるテルビウム吸着能

### 4. 結言

大腸菌ゲノム機能を改変することで、モリブデンを蓄積する大腸菌形質転換体を作製した。これを利用することで、モリブデン資源化を可能とするバイオアキュミュレーション技術の確立が期待される。

また、大腸菌細胞の表層にテルビウム結合ペプチドを提示した大腸菌形質転換体を獲得した。これを利用することで、テルビウム資源化を可能とするバイオアブゾープション技術の確立が期待される[6]。

謝辞：本研究は山本兼由教授の丁寧なご指導をはじめ、実験材料の提供では本学の吉多美祐博士、D2 三宅裕可里氏のご協力のもとで行われました。深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Andreini *et al.* (2008) *J. Bio. Inorg. Chem.* 13:1205-1218.
- 2) Yannone *et al.* (2012) *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:89-95.
- 3) 河野允寿 (1963) 東京都立工業奨励館報告 15:59-62.
- 4) 山本兼由 (2015) バイオベース資源確保戦略
- 5) Nitz *et al.* (2003) *Chembiochem.* 4 (4): 272-276
- 6) 山本兼由ら (2018) PCT/JP2018/017313